

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian dan Peternakan, Universitas Muhammadiyah Malang. Waktu penelitian dilaksanakan pada semester genap yaitu semester 8 pada bulan April 2018 hingga bulan Oktober 2018.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat – alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi timbangan digital, timbangan analitik, pipet tetes, pipet ukur, filler, *waterbath*, gelas beker, gelas ukur, *thermometer*, vortex, tabung reaksi, spektrovotmeter UV-Vis Genesys 20, labu ukur, enlenmeyer, corong pisah, cawan petri, cawan porselen, batang L, Bunsen, *Laminar air flow*, *Colony counter*, spidol, *color reader*, pH meter tipe Lab 875, rak tabung reaksi, *tube sentrifuge*, Kuvet, botol semprot, oven, inkubator, dan lemari asam.

3.2.2 Bahan

Bahan – bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi aluminium foil, splastik PP (*polypropylene*), kertas saring, Kacang kedelai jenis Anjasmoro, air, gula, susu skim, plastik wrap, starter *L. bulgaricus*, Kulit buah naga merah didapat dari penjual buah di Tlogomas dengan umur panen 2 bulan, aquades, etanol teknis, NaOH 0,1 N Teknis, indikator PP, Media agar MRS, NaK Tartrat, CuSO₄ Pro Analisis, AlCl₃, Na Asetat, Na₂CO₃ Pro Analisis, Amilum, Iodin, HCl, dan Petroleum eter teknis.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan sampel penelitian yaitu kulit buah naga merah yang nantinya akan diaplikasikan pada produk Soyghurt untuk melihat aktifitas senyawa Isoflavon pada soyghurt dan pengaruh yang akan dihasilkan dari pigmen antosianin terhadap Soyghurt yang dihasilkan. Rancangan Percobaan yang akan digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial menggunakan 2 faktor yaitu faktor I adalah penambahan ekstrak kulit buah naga (10 %, 20%, dan 30%) dan faktor II adalah lama fermentasi (12 Jam, 18 Jam, dan 24 Jam). Ulangan yang dilakukan sebanyak 3 kali dijadikan sebagai kelompok. Secara rinci faktor perlakuan penelitian sebagai berikut:

- a. Faktor I yaitu penambahan ekstrak kulit buah naga (10 %, 20%, dan 30%)

F1 : Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 10%.

F2 : Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 20%.

F3 : Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 30%.

- a. Faktor II yaitu Lama Fermentasi (12, 18, dan 24 Jam).

K1 : Lama Fermentasi 12 Jam

K2 : Lama Fermentasi 18 Jam

K3 : Lama Fermentasi 24 Jam

Tabel 1. Matriks Kombinasi Perlakuan Penambahan Ekstrak Kulit Buah Naga Merah dan Lama Fermentasi pada Soyghurt

Penambahan Ekstrak Kulit Buah Naga Merah				
		F1	F2	F3
Lama Fermentasi	K1	F1K1	F2K1	F3K1
	K2	F1K2	F2K2	F3K2
	K3	F1K3	F2K3	F3K3

Keterangan :

F1K1 = Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 10% dan Lama Fermentasi selama 12 Jam.

F1K2 = Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 10% dan Lama Fermentasi selama 18 Jam.

F1K3 = Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 10% dan Lama Fermentasi selama 24 Jam.

F2K1 = Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 20% dan Lama Fermentasi selama 12 Jam.

F2K2 = Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 20% dan Lama Fermentasi selama 18 Jam.

F2K3 = Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 20% dan Lama Fermentasi selama 24 Jam.

F3K1 = Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 30% dan Lama Fermentasi selama 12 Jam.

F3K2 = Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 30% dan Lama Fermentasi selama 18 Jam.

F3K3 = Penambahan ekstrak kulit buah naga merah 30% dan Lama Fermentasi selama 24 Jam.

Penelitian menghasilkan 9 kombinasi perlakuan yang akan di ulang sebanyak 3 kali ulangan. Analisa yang dilakukan pada produk meliputi Total BAL, intensitas warna, total Flavonoid, protein, lemak, total padatan terlarut, antioksidan, pH, total asam tertitasi, viskositas, dan organoleptik (rasa, aroma, kenampakan, kekentalan).

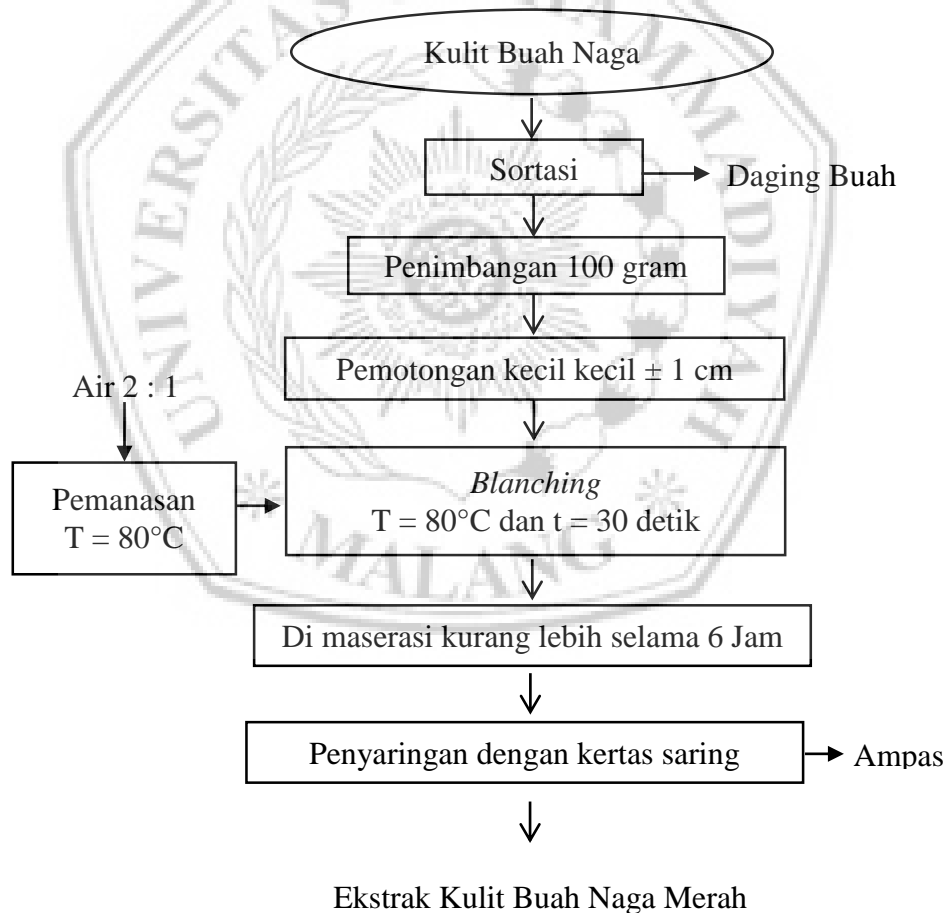
3.4 Prosedur Penelitian

Penelitian terdiri dari 4 kegiatan. Kegiatan pertama adalah proses ekstraksi sari kulit buah naga merah. Kegiatan kedua adalah proses pembuatan sari kedelai. Kegiatan ketiga adalah proses pembuatan Soyghurt dengan penambahan ekstrak kulit buah naga merah, dan kegiatan keempat adalah analisa sifat fisikokimia, mikrobiologis, dan organoleptik soyghurt,

3.5 Tahap Penelitian

3.5.1 Ekstraksi Kulit Buah Naga Merah

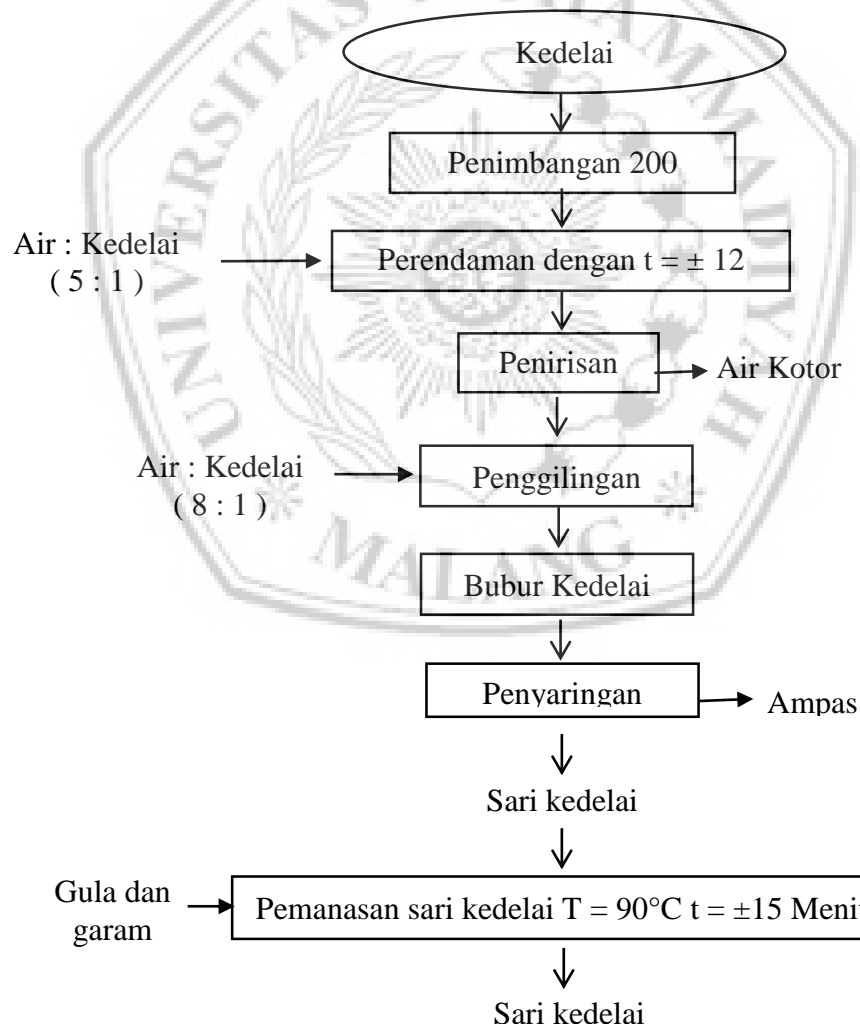
Ekstraksi kulit buah naga merah dimulai dengan mensortasi kulit buah naga terlebih dahulu kemudian menimbang kulit buah naga sebanyak 100 gram. Selanjutnya memotong kulit buah naga kecil kecil kurang lebih ukuran 1 cm x 1 cm, kemudian menambahkan dengan air 2 : 1. Selanjutnya di *blanching* selama 30 detik pada suhu 80°C, kemudian kulit buah naga direndam dengan air blanching tadi hingga 6 jam, metode ini dikenal dengan metode maserasi. Diagram alir ekstraksi kulit buah naga merah tampak pada Gambar 4.



Gambar 1. Diagram Alir Ekstraksi Pigmen Antosianin Kulit Buah Naga Merah (Kusuma dkk, 2012)

3.5.2 Pembuatan Sari Kedelai

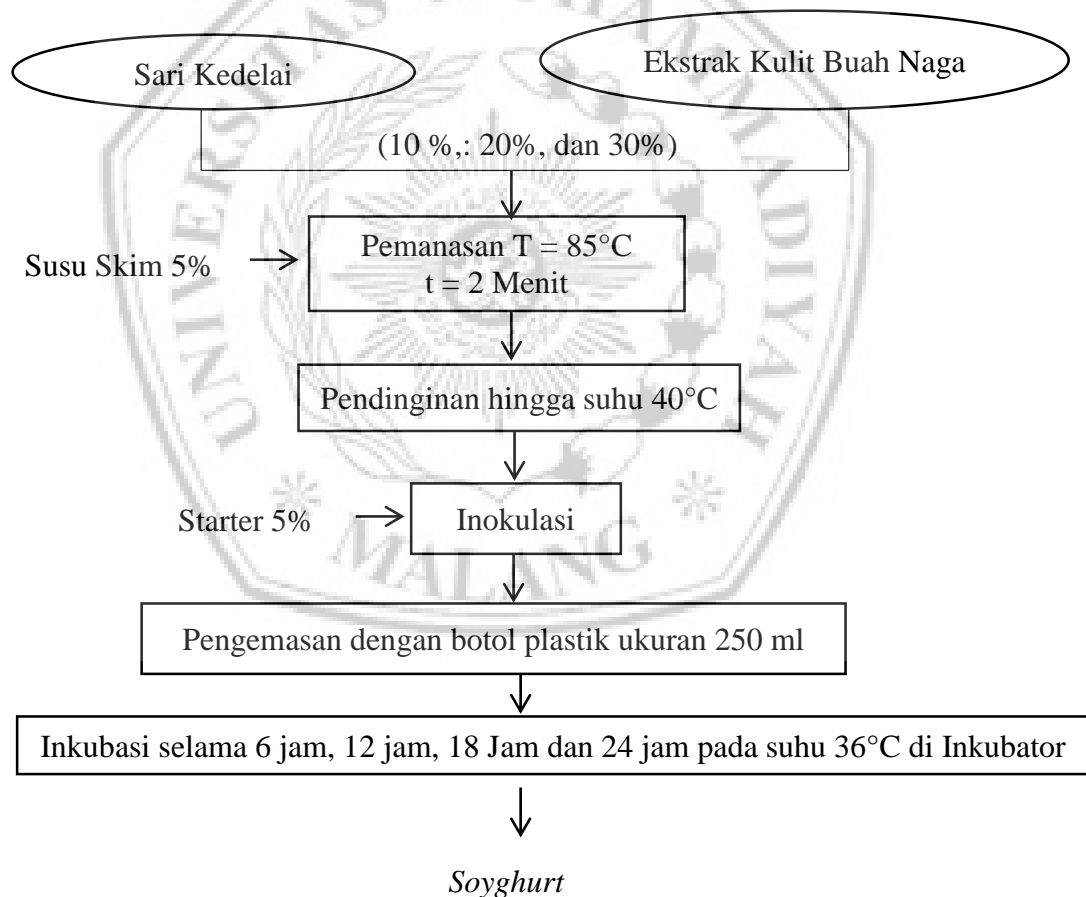
Sari kedelai atau susu kedelai diperoleh dengan cara membersihkan 200 gram kedelai dan merendam dengan air sebanyak 1 L selama ± 12 Jam. Kemudian kedelai diblender dengan menambahkan air banding kedelai 8 : 1. Selanjutnya menyaring hasil gilingan dengan kain saring hingga diperoleh sari kedelai encer, lalu merebus sari kedelai selama ± 15 menit dengan api kecil lalu menambahkan gula sebanyak 240 gram atau 15% dari volume sari kedelai dan garam secukupnya untuk penguat rasa dari sari kedelai (Amrin, 2005 dengan sedikit modifikasi). Diagram alir pembuatan sari kedelai tampak pada Gambar 5.



Gambar 2. Diagram Alir Pembuatan Sari/Susu Kedelai (Kusuma dkk, 2012)

3.5.3 Pembuatan Soyghurt

Pembuatan Soyghurt diawali dengan memanaskan 200 ml sari kedelai yang telah ditambahkan ekstrak kulit buah naga dengan 10%, 20%, dan 30% dengan menambahkan susu skim 5% pada saat pemanasan sari kedelai pada suhu 85°C selama kurang lebih 2 menit.. Kemudian mendinginkan sari kedelai hingga susu mencapai 40°C lalu menginokulasi dengan starter *L. bulgaricus* sebanyak 5% dan mengemasnya dengan botol plastik. Susu yang sudah diinokulasi dengan starter lalu diinkubasi pada inkubator pada suhu 36°C - 37°C selama 12 jam, 18 jam, dan 24 jam. Diagram alir pembuatan soyghurt tampak pada Gambar 6.



Gambar 3. Diagram Alir Pembuatan Soyghurt (Bagiastra, 1984)

3.6 Prosedur Pengamatan

3.6.1 Penentuan Total Flavonoid (Azizah, 2014)

1. Melakukan pengenceran 1 ml Soyghurt sebanyak 5 kali pengenceran.
2. Melarutkan sampel Soyghurt sebanyak 1 ml dari hasil pengenceran dan melarutkan dengan aquades dalam labu takar 10 ml.
3. Menyaring larutan sampel dengan kertas saring, lalu mengambil filtrat sebanyak 0,25 ml kedalam tabung reaksi.
4. Menambahkan 0,05 ml $AlCl_3$ 10%, 0,05 ml Na Asetat 1 M, dan 1,4 ml aquades.
5. Melapisi atau menutupi tabung reaksi dengan aluminium foil, lalu maserasi selama 30 menit,
6. Membaca absorbansi dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang 432 nm.
7. Menentukan kadar flavonoid dengan menggunakan rumus dari kurva quiserten yang telah dibuat seblumnya.

3.6.2 Analisa Antioksidan (Robinson, 1983)

Prinsip dari uji DPPH adalah penghilangan warna untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung menjangkau radikal DPPH, yang dilihat dari absorbansi pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer. Adapun tahapan analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH sebagai berikut.

A. Pembuatan Larutan DPPH

1. Menghitung kebutuhan serbuk DPPH dengan rumus:

$$Konsentrasi = \frac{\text{massa (mg)}}{Mr \times \text{volume (L)}}$$

2. Menimbang serbuk DPPH sesuai yang dibutuhkan;
3. Memasukkan serbuk DPPH ke dalam labu ukur;

4. Melarutkan dengan etanol 96% hingga batas tera, dan menghomogenkannya;
5. Menyimpan larutan DPPH pada kondisi gelap dan tertutup rapat pada suhu dingin.

B. Ekstraksi Bahan Aktif

1. Menimbang berat sampel sebanyak 1 gram;
2. Menambahkan larutan etanol 96% sebanyak 9 ml dan menutup tube;
3. Melakukan sentrifuse selama 10 menit;
4. Menyaring sampel hingga diperoleh filtrat.

C. Analisis Aktivitas Antioksidan

1. Memasukkan filtrat sebanyak 4 ml kedalam tabung reaksi yang telah dibungkus *aluminium foil*;
2. Menambahkan 1 ml larutan DPPH.
3. Menutup mulut tabung dengan *aluminium foil*;
4. Menyimpan sampel pada kondisi gelap selama 30 menit;
5. Membaca serapan panjang gelombang dengan spektrofotometer UV Vis pada $\lambda = 517 \text{ nm}$.
6. Menghitung % inhibisi dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs blanko}} \times 100\%$$

3.6.3 Penentuan Total Asam Titrasi (AOAC, 1995)

1. Mengambil sampel sebanyak 10 ml dan menambahkan 100 mL aquades, kemudian mengocok dan menyaring dengan kertas saring.
2. Mengencerkan filtrat dengan aquades dalam labu ukur 100 mL hingga batas tera, kemudian mengambil 20 mL filtrat ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 3 tetes indikator PP.

3. Melakukan titrasi pada sampel dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terlihat warna merah muda konstan dan catat volume NaOH. Total asam dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Total Asam (\%)} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH} \times 90 \times \text{fp} \times 100}{\text{Berat bahan} \times 1000}$$

Keterangan:

FP = Faktor pengenceran

BM = Berat molekul asam laktat = 90

3.6.4 Penentuan Total BAL (Fardiaz, 1989)

1. Mengisi 7 tabung reaksi dengan 9 ml aquades
2. Melakukan pengenceran dengan cara memasukkan 1 ml sampel kedalam tabung reaksi 1
3. Mengsentrifugasi tabung 1 dengan vortex
4. Mengambil 1 ml larutan pada tabung reaksi 1 dan memasukkan pada tabung reaksi 2
5. Melakukan cara yang sama seperti cara pada poin ke 1,2,3 pada keseluruhan tabung hingga tabung ke 7
6. Memasukkan 1 ml larutan dari tabung 7 kedalam media agar
7. Meratakan dengan batang L dan menutupnya
8. Menyimpan selama 2 hari
9. Menghitung jumlah koloni BAL dengan *Colony Counter*
10. Jika jumlah BAL > 300 atau BAL < 30 maka tidak perlu dihitung sebab TBUD (Terlalu banyak untuk dihitung) atau TSUD (Terlalu sedikit untuk dihitung)
11. Jika total BAL < 300 atau BAL > 30 maka harus dihitung
12. Rumus Perhitungan adalah sebagai berikut

$$\text{Total Bakteri Asam Laktat} = \frac{\text{Jumlah Koloni BAL}}{\frac{1}{\text{Pengenceran}}}$$

3.6.5 Penentuan Intensitas Warna (*Colour Reader*, Minolta)

1. Menyiapkan sampel dalam plastik PP (*polypropilene*) atau transparan
2. Menghidupkan *colour reader*
3. Menentukan target L, a, b. dimana, L adalah kecerahan, nilai positif (+) berarti cerah, nilai negatif (-) berarti suram ; Axis a nilai positif (+) berarti merah, nilai (-) berarti hijau ; Axis b, nilai (+) berarti kuning, nilai (-) berarti biru
4. Mengukur warna.

3.6.6 Penentuan pH (AOAC, 1984)

1. Membersihkan elektroda pH meter dengan aquades
2. Mengeringkan elektroda dengan tisu
3. Mencelupkan elektroda pada buffer 4 dan 7
4. Mencelupkan elektroda pada sampel
5. Mencatat pH yang dihasilkan
6. Mencuci elektroda dengan aquades dan mengeringkan dengan tisu

3.6.7 Analisa Viskositas (Viskometer Oswald)

Spindle dipasang pada lengan spindle. Spindle dimasukkan ke dalam sampel yang diuji. Motor dihidupkan sehingga spindle berputar dan jika jarum dial menunjukkan angka stabil motor dimatikan. Mencatat angka yang ditunjukkan oleh jarum dial, setiap sampel diukur 5 kali kemudian diambil rata-rata. Nilai rata-rata dikalikan dengan faktor pengali yang sesuai dengan kecepatan dan nomor spindle yang dipakai merupakan nilai kekentalan produk yang diuji.

3.6.8 Analisa Lemak Metode Hidrolisa Asam (Sudarmadji, 2007)

1. Timbang sampel 2 gram, tambahkan 4 ml etanol 96% dan 10 ml HCl (25 HCl + 11 aquades). Sebelumnya siapkan cawan porselin kosong dan timbang beratnya;
2. Letakkan sampel dalam waterbath selama 30-40 menit dengan suhu 70°C, kemudian tambah dengan 10 ml etanol 96% dan dinginkan;
3. Tambahkan 25 ml petrolium benzene kedalam sampel;
4. Masukkan sampel dalam corong pisah, kemudian terdapat 2 lapisan cairan lalu ambil cairan yang ada di lapisan atas atau cairan bening;
5. Masukkan sampel dalam oven selama 1-2 jam, kemudian dinginkan dalam desikator hingga berat konstan lalu timbang berat akhir;
6. Kadar lemak dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{\text{Berat akhir} - \text{Berat cawan}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

3.6.9 Analisa Protein Metode Lowry (Apriyantono, 1989)

1. Pereaksi

1. Larutkan natrium karbonat 2% dalam larutan NaOH 0,1 N pereaksi (1);
2. Tembaga sulfat 0,5% dalam larutan Na.K tatrak 1% pereaksi (2) (dibuat hanya pada waktu akan digunakan);
3. Campuran 50 ml pereaksi (1) dengan 1 ml pereaksi (2) (hanya pada waktu akan digunakan, hanya stabil selama 1 hari);
4. Pereaksi folin Cciocalteau (pereaksi fenol). Biasa tersedia secara komersil, larutkan dengan air 1:1 sebelum digunakan (3);
5. Larutan protein standar 0,25 mg/ml (larutan borin albumin) (4).

2. Pembuatan Kurva Standar

1. Masukkan ke dalam tabung reaksi : 0 (blanko), 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 dan 1.0 ml protein standar. Tambahkan aquades sampai volume total masing-masing 4 ml;
2. Tambahkan 5,5 ml pereaksi (3) ke dalam masing-masing tabung reaksi, campur merata dan biarkan selama 10 – 15 menit pada suhu kamar;
3. Tambahkan 0,5 ml pereaksi (4) ke dalam masing-masing tabung reaksi, kocok merata dengan cepat setelah penambahan. Biarkan selama kurang lebih 30 menit sampai warna biru terbentuk;
4. Ukur absorbansi pada panjang gelombang 650 nm dengan menggunakan spektrofotometer;
5. Buat kurva standar.

3. Pengukuran Sampel

1. Sampel disaring lalu disentrifuse. Supernatan kemudian ditambahkan air sampai volume total masing-masing 1 ml;
2. Kedalam masing-masing tabung reaksi tambahkan 1 ml Trichloro Acetic Acid (TCA) 10%. Sentrifuse pada 3000 rpm selama 10 menit sampai protein yang terdenaturasi mengendap, supernatant dibuang dengan cara dekantansi;
3. Ke dalam endapan tambahkan 2 ml etil eter, campur merata, kemudian sentrifuse kembali. Ini akan menolong menghilangkan residu TCA. Biarkan mengering pada suhu kamar;
4. Ke dalam endapan kering ditambahkan 4 ml air, campur merata. Tambahkan 6 ml pereaksi Biuret.
5. Ambil sampel 1ml dan tambahkan aquades sampai volume total masing-masing 4 ml;

6. Tambahkan 5,5 ml pereaksi (3) ke dalam masing-masing tabung reaksi, campur merata dan biarkan selama 10-15 menit pada suhu kamar;
7. Tambahkan 0,5 pereaksi (4) ke dalam masing-masing tabung reaksi, kocok merata dengan cepat setelah penambahan;
8. Biarkan selama kurang lebih 30 menit sampai warna biru terbentuk;
9. Ukur absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm.

3.6.10 Analisa Total Padatan Terlarut (Wahyudi dan Dewi, 2017)

1. Menyipakan bahan dan alat *Hand-Refractometer*
2. Meletakkan sampel secukupnya dengan menggunakan pipet atau sendok pada plat kaca alat
3. Melihat derajat yang tertera pada alat dengan bantuan cahaya
4. Derajat atau skala yang tertera merupakan derajat brix (°Brix)

3.6.11 Organoleptik (Setyaningsih, 2010)

Melakukan penilaian organoleptik terhadap aroma , rasa, dan kenampakan pada produk *Soyghurt*. Metode yang digunakan adalah metode hedonik (kesukaan). Pengujian dilakukan oleh 30 panelis tidak terlatih. Panelis diminta untuk memberikan penilaian menggunakan uji skala hedonik yang terdiri dari 5 nilai dengan 4 pernyataan tampak pada Tabel 5.

Tabel 2. Nilai Uji Organoleptik

No	Rasa	Aroma	Kenampakan	Kekentalan
1	Sangat Tidak	Sangat Tidak	Sangat Tidak	Sangat Tidak
2	Enak	Suka	Menarik	Kental
3	Tidak Enak	Tidak Suka	Tidak Menarik	Tidak Kental
4	Cukup Enak	Cukup Suka	Cukup Menarik	Cukup Kental
5	Enak	Suka	Menarik	Kental
	Sangat Enak	Sangat Suka	Sangat Menarik	Sangat Kental

Pengujian dilakukan dengan memberikan 9 sampel dengan acak dimana pada setiap sampel telah diberikan kode masing masing kepada 30 orang panelis. Selanjutnya panelis diberikan waktu untuk mencoba 9 sampel yang ada secara urut, kemudian setelah mencoba sampel panelis memberikan penilaian terhadap 9 sampel yang telah dicoba segera setelah mencoba pada masing – masing sampel agar panelis tidak lupa jika penilaian dilakukan setelah selesai mencoba semua sampel. Panelis menilai sampel sesuai dengan nilai hedonik yang sudah ada.

3.7 Analisa Data

Data dari kesembilan sampel yang sudah didapat selanjutnya dilakukan uji ragam dengan perhitungan sesuai rancangan acak kelompok (RAK) Faktorial, jika terjadi atau terdapat perbedaan secara nyata atau pengaruh secara nyata maka pengujian akan dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) menggunakan aplikasi komputer *Microsoft Excel* guna menentukan level terbaik dari masing – masing perlakuan.